

CAPÍTULO 2.- EL MICROSCOPIO ÓPTICO.

Por: **Laura Isac** (GBS)

► INTRODUCCIÓN

En el estudio de una muestra de fango activo, el microscopio óptico es una herramienta indispensable que nos va a permitir no sólo la identificación y cuantificación de las distintas especies pobladoras (bacterias y protozoos, principalmente), sino el conocimiento de otras características relacionadas con la estructura de la unidad morfológica y estructural de dicha suspensión biológica, es decir, el flóculo de fango activo. Así por ejemplo, ante la presencia de un problema de operación de tipo biológico que se manifestase como una deficiente separación sólido-líquido en el clarificador, las técnicas de identificación de microorganismos y de estudio de la estructura flocular, van a hacer posible el aislamiento y cuantificación de los organismos responsables así como el conocimiento del nivel de repercusión sobre la organización del flóculo. Esta información, nos permitirá catalogar el problema como *crecimiento disperso*, *bulking viscoso*, *bulking filamentoso*, *foaming*,



Figura 1: El microscopio óptico (Microscopio Óptico NIKON-ELIPSE E-2000).

Nota: al final del capítulo, en la Tabla I, se recogen diversos problemas que surgen durante la observación microscópica así como sus soluciones.

pin point floc o *subida de fangos* (Jenkins et al., 2004) y actuar en consecuencia sobre el proceso.

Un examen microscópico de estas características requiere de distintos niveles de observación que, entre otros aspectos, se han de corresponder con distintas necesidades en la magnificación. Así pues, el aumento requerido para una primera exploración de la muestra, no será el mismo que el necesario para la observación en detalle de la estructura corporal de un protozoo ciliado. La capacidad de aumento de un microscopio se denomina *magnificación* (M) y se corresponde con la expresión:

$Magnificación = M \text{ ocular} \times M \text{ objetivos} \times M \text{ optovar}$ (si éste existe)

En microscopía óptica, aumentos de 1.500x estarían próximos al límite máximo, ya que además de la magnificación, existe la *resolución*, es decir, aquella propiedad que permite observar dos puntos adyacentes como unidades distintas. Si bien la magnificación podría incrementarse prácticamente sin límite, la resolución está limitada por las propiedades físicas de la luz. En un microscopio óptico, los límites de resolución se sitúan en aproximadamente 0,2 μm , lo que significa que dos objetos que se encuentren más próximos que esta distancia no pueden visualizarse como entidades distintas. El poder de resolución está determinado por la longitud de onda de la luz y una propiedad innata de la lente que se denomina *apertura numérica*, medida de la capacidad de captación de la luz por la lente.

En general, existe una relación directa entre la capacidad de aumento y la apertura numérica de una lente, ya que una lente de alto aumento presentará una alta apertura numérica. La mayoría de los microscopios poseen oculares de aumento de 10 a 15x y objetivos desde 5 a 100x aumentos. Los objetivos de 100x (de elevada apertura numérica) requieren del empleo de aceite de inmersión para evitar la presencia de aire entre el objetivo y la preparación y se denominan *objetivos de inmersión*. Este tipo de aceites se utilizan porque tienen una mayor apertura numérica que el aire y un mayor índice de refracción, lo que incrementa la resolución. Con este tipo de objetivos la *distancia de trabajo* ó distancia que queda libre entre el objetivo en uso y la preparación, es prácticamente nula. En general, cuanto mayor sea la resolución del objetivo, menor será su distancia de trabajo.

► LOS ELEMENTOS DE UN MICROSCOPIO ÓPTICO. PROCEDIMIENTOS HABITUALES: ILUMINACIÓN DE KÖHLER, CENTRADO DE LOS ANILLOS DE FASE, EXPRESIÓN DE LOS AUMENTOS EN LA MICROFOTOGRAFÍA Y MICROMEDICIONES.

El microscopio óptico es un elemento indispensable en el laboratorio de una estación depuradora (Figura 1), que

si bien no ha de ser especialmente complejo, requiere de unos elementos básicos representados por objetivos (10x, 20x, 40x y 100x), algunos de ellos dotados de contraste de fases, un micrómetro ocular calibrado y equipo de microfotografía. Como material accesorio de microscopía son necesarios: una cámara de recuento (*Neubauer, Neubauer improved y/o Fuchs-Rosenthal*, p ej.) para el cómputo de pequeños flagelados o, empleada también, en ciertas técnicas de cuantificación de bacterias filamentosas, portaobjetos, cubreobjetos de varios tamaños (24 x 24 mm y 18 x 18 mm, principalmente), aceite de inmersión y solución limpiadora para las lentes.

En la descripción de las distintas partes de un microscopio, podemos encontrarnos con los siguientes *elementos mecánicos, de iluminación y ópticos*:

Platina

La platina está situada sobre el estativo o soporte y sobre ella se coloca el portaobjetos, que mediante un sistema de traslación dotado de mandos, podrá hacerse desplazarse en las dos direcciones del plano (x e y). Reglas milimétricas situadas sobre la platina permiten conocer el alcance del movimiento así como la localización precisa de cualquier área de interés de la preparación.

Mandos de enfoque

Permiten el desplazamiento en el plano vertical de la platina, alejando ó acercando la preparación hacia los elementos ópticos. El enfoque macrométrico permite una aproximación rápida a la preparación o enfoque "grueso", mientras que el micrométrico proporciona un enfoque "fino" de la misma.

Fuente de iluminación

Suele ser una lámpara halógena de bajo voltaje (6-12 v y 25-100 W), cuya luminosidad puede ser regulada mediante un potenciómetro. La iluminación es una cuestión de especial importancia en el caso de la microfotografía. Es recomendable controlar el haz lumínico cada cierto tiempo, lo que puede hacerse en la revisión anual del microscopio.

Filtros

Situados sobre un *portafiltros*, los más habituales son el filtro verde y el azul. Mientras que el verde se utiliza en la óptica de contraste de fases, al aumentar el poder de resolución, el filtro azul se emplea en campo claro, para observar tinciones o resaltar contornos en organismos vivos.

Condensadores

Situados al pie del cuerpo principal se encuentran el *condensador de campo* y su diafragma, quienes tienen como misión amplificar y colimar los rayos luminosos proyectados por la fuente luminosa. Situados en la parte inferior a la platina se encuentran el *condensador de apertura*, con su diafragma y elementos de centrado. Este condensador tiene como misión hacer converger la luz hacia la preparación. El centrado del condensador se realiza cerrando el diafragma de campo y llevando al centro el punto luminoso con ayuda de los me-

canismos de centrado. En algunos microscopios, además, es necesario situar a la altura adecuada el diafragma de campo. A continuación se presenta un esquema de este procedimiento:

- Elegir el objetivo 10x
- Subir el condensador de apertura lo más arriba posible y abrir su diafragma al máximo
- Enfocar la preparación
- Cerrar el diafragma de campo para ver si la iluminación está centrada
- Centrar la iluminación
- Bajar el condensador de apertura hasta que se observe la forma poligonal de la imagen del diafragma de campo
- Abrir el diafragma de campo para iluminar completamente la preparación
- Contrastar la preparación cerrando el diafragma de apertura hasta conseguir el contraste deseado

La colocación exacta de los elementos de iluminación, condensadores y diafragmas, permite obtener una iluminación homogénea de la preparación al mismo tiempo que eficaz para las pupilas de los objetivos. Este procedimiento está basado en los principios de la *Iluminación de Köhler*.

Objetivos

Son los componentes ópticos responsables de la resolución de las imágenes. Han de estar colocados en un orden lógico, de menor a mayor aumento, 10x, 40x y 100x. *Los objetivos de campo claro y contraste de fases* se distinguen gracias a la leyenda "Ph" de este último. En la óptica de contraste de fases, el condensador ilumina con un anillo de luz que debe estar sintonizado (en fase) con el anillo de fases del objetivo en uso. El procedimiento de ajuste del contraste de fases se esquematiza a continuación:

- Seleccionar el objetivo de fases sobre el que se quiera hacer el ajuste
- A. Si el condensador es de revolver, ponerlo en la posición Ph correspondiente
- B. Si el condensador no es de revolver, abrir el diafragma del condensador de apertura al máximo y colocar la inserción "Ph" correspondiente
- Retirar un ocular para ver los anillos de fases, el blanco del condensador y el negro del ocular. Situar los anillos concéntricos (este paso diferirá en función de que el condensador sea o no de revolver)

Tanto en campo claro como en contraste de fases, los objetivos 100x requieren del empleo de aceite de inmersión. Esto significa que tras ser utilizados, hay que retirar el aceite de la lente con un paño suave impregnado en una solución éter/etanol 3:1. También es recomendable la limpieza de las demás lentes de vez en cuando con esta misma solución.

Oculares

Están formados por dos lentes que se sitúan sobre un soporte móvil que permite que sean ajustadas a la distancia ocular del observador. Estas lentes son las encargadas de amplificar la imagen resuelta por los objetivos, a la vez que la invierten. Uno de los oculares permite un ajuste diferencial para

las dioptrías de cada ojo. En el caso de la microfotografía, la torreta es triocular, reservándose uno de los oculares (distinto de los dos anteriores) para la adaptación de la cámara fotográfica. Normalmente, uno de los oculares consta de *micrómetro*, es decir, un disco intercalado entre sus lentes que presenta una “especie” de regla con una serie de marcas distribuidas regularmente (Figura 2).

Para la realización de *micromediciones*, procedimiento habitual y necesario en la identificación taxonómica de especies, se requiere disponer de un micrómetro ocular calibrado. La calibración del micrómetro se lleva a cabo mediante la alineación del micrómetro y del *portaobjetos milimetrado*, procedimiento que permite conocer, para cada objetivo, la longitud real de las distintas marcas del micrómetro (Figura 2). El portaobjetos milimetrado es un portaobjetos “especial”, que tiene grabada una regla de un milímetro de longitud con cien marcas de 0,01 mm. Esta calibración nos va a permitir utilizar dicho micrómetro a modo de escala para las distintas magnificaciones.

Aunque ya se explicaba anteriormente la manera de calcular la magnificación de una preparación, simplemente multiplicando el factor del objetivo por el del ocular, en la microfotografía deben de efectuarse cálculos para poder referirse al aumento del positivo en papel. Mediante la realización de microfotografías del portaobjetos graduado bajo las distintas magnificaciones y posterior positivado de éstas, se puede obtener referencia del tamaño de elementos de interés de la preparación sobre el papel. Y es que, en la microfotografía, el aumento se indica con barras de una longitud determinada que, dibujadas en el papel, indican una cierta longitud real (Figura 3).

Las numerosas innovaciones tecnológicas en los campos de la informática y la electrónica han hecho avanzar también a la microscopía. La utilización de nuevos accesorios como vídeo-cámaras o vídeo-impresoras habrían de ser tenidos en cuenta a la hora de hablar de los componentes del microscopio.

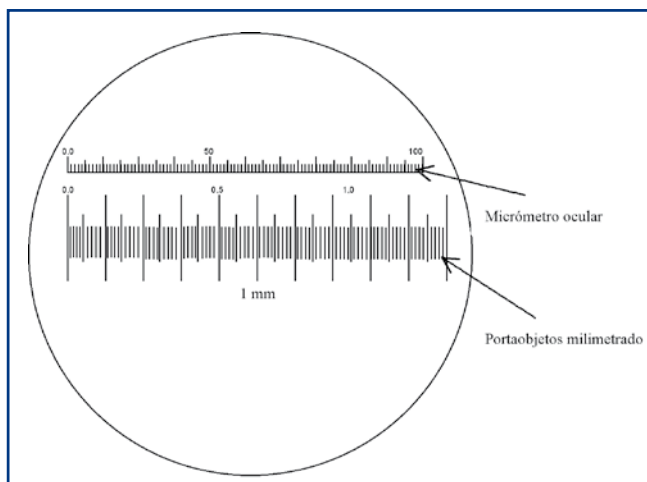


Figura 2: Visión al microscopio óptico bajo el objetivo 10x, durante la calibración del micrómetro.

► LAS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

Si anteriormente se mencionaban las distintas necesidades de magnificación en el estudio de una muestra, también es cierto que la observación de microorganismos más pequeños como bacterias, determinadas estructuras de protistas o la propia organización del flóculo, que pueden ser dificultosas en campo claro, son más fácilmente observables con otras técnicas microscópicas, como es el contraste de fases. Normalmente, el equipamiento microscópico en un laboratorio de aguas residuales, tan sólo cuenta con la óptica de contraste de fases, además de la de campo claro. Las restantes técnicas microscópicas y otras no recogidas aquí, se utilizan en investigación.

El campo claro

Es la iluminación “normal”. Los componentes de la muestra se visualizan gracias a las diferencias de contraste que existen entre ellos y el medio que los rodea (Figura 3A). Las diferencias de contraste se producen porque las células o elementos más grandes, como los flóculos de fango activo, absorben o dispersan la luz en diferentes grados. Por esta razón, esta iluminación se emplea con tinciones ó muestras en las que los microorganismos son pigmentados, ya que el contraste se incrementará debido al color (Figura 3C). El contraste de la preparación también puede controlarse en campo claro con el diafragma del condensador (diafragma de apertura).

El contraste de fases

Es una técnica que se utiliza para estudiar preparaciones de densidades homogéneas, en las que la baja capacidad de absorción de la luz de sus elementos (las células y el medio), hace que la imagen obtenida no presente diferencias de luminosidad entre ellos. El contraste de fases permite la visualización de células sin necesidad de tinción (Figura 3B). Este tipo de óptica se basa en el hecho de que las células poseen índices de refracción distintos al medio y por lo tanto producen un desvío en los rayos de luz que las atraviesan, que son retardados. Este efecto es amplificado por un anillo especial que posee el objetivo de los microscopios de contraste de fases, lo que da lugar a la formación de una imagen oscura con un fondo brillante.

► OTRAS TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN

Campo oscuro

Es un tipo de microscopio óptico, en el que se ha modificado el sistema de iluminación, de manera tal que la luz incide sobre la muestra sólo desde los lados. La única luz que es capaz de entrar en el objetivo es la que, al ser dispersada por la muestra, incide sobre el objetivo; de ahí que los microorganismos se observen brillantes sobre un fondo oscuro. La resolución en los microscopios de campo oscuro es bastante alta, y pueden observarse con ellos objetos de difícil visualización en campo claro o en contraste de fases. Se utiliza para preparaciones con muy poco contraste (p. ej. sin teñir), en las

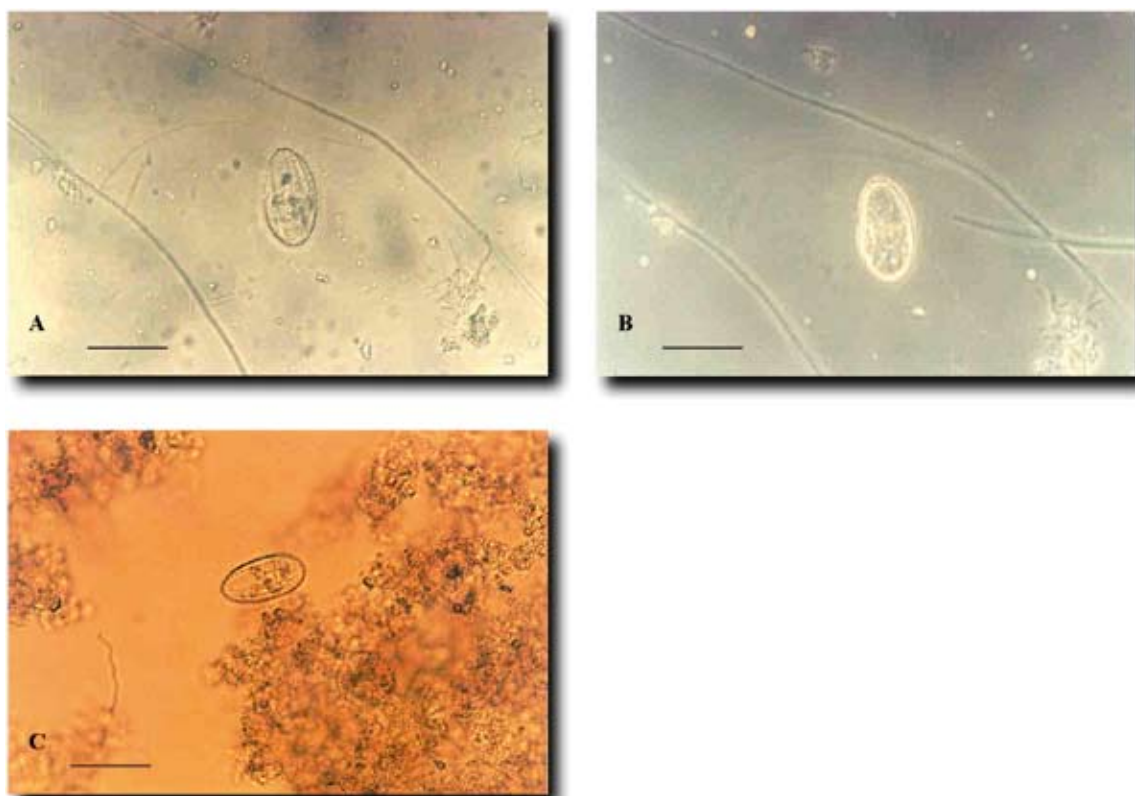


Figura 3: *Uronema sp.* en campo claro (A) y bajo contraste de fases (B). *Uronema sp.* en campo claro en un medio adicionado con lugol para aumentar el contraste y favorecer la fijación (C). 400x. Barra = 40 μm

que la muestra se verá como un negativo fotográfico sobre un fondo oscuro.

Microscopía de fluorescencia

Utilizada para visualizar muestras capaces de emitir fluorescencia, ya sea debida a la capacidad que presentan algunos microorganismos debido a ciertos componentes celulares (autofluorescencia) o mediante la adición de sustancias capaces de teñir la preparación (fluorocromos). En este segundo caso, la muestra estará marcada con colorantes fluorescentes, o bien la fijación del colorante se realiza con un anticuerpo marcado (inmunofluorescencia). En cualquier caso, la *fluorescencia* se define como la propiedad que poseen algunas sustancias denominadas fluorescentes, las cuales, bajo la acción de radiaciones de onda corta (luz ultravioleta), pueden emitir otras radiaciones de longitud de onda más largas denominadas de fluorescencia (radiación visible).

Para que la emisión sea selectiva, los filtros de fluorescencia habrán de ser adecuados. Normalmente, se emplea un filtro que delimita la banda de excitación y un segundo filtro o filtro “de barrera” que sólo deja pasar la fluorescencia y elimina los restos de la luz de excitación. Las técnicas basadas en la microscopía de epifluorescencia están adquiriendo cada vez mayor auge gracias al desarrollo, entre otras, de las técnicas de estimación de la biomasa viva y de determinación de la

actividad biológica, de gran utilidad en el campo de los procesos de depuración de aguas residuales.

Contraste de polarización

En estos microscopios la luz es polarizada y aunque no necesita de objetivos especiales, sí de un polarizador situado entre la fuente de luz y el condensador, y de un analizador entre el objetivo y el ocular. Se utilizan para la observación de materiales birrefringentes, tal es el caso de algunas disciplinas como la Mineralogía o la Petrografía.

Contraste Interferencial de Normarski

En esta técnica se combina la luz polarizada con un principio similar al del contraste de fases, dando como resultado una imagen similar a la aportada por un contraste de fases de gran resolución pero con un marcado efecto de relieve y a color. Este tipo de óptica, aunque de resultados muy satisfactorios, requiere un equipamiento caro, constituido por accesorios como un condensador especial y prismas de polarización, que hacen que su uso sea muy restringido.

► BIBLIOGRAFÍA

- > Jenkins, D., Richard, M. G. y Daigger, G. T. (2004). *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. Lewis Publishers.

PROBLEMA	CAUSA	ACCIÓN
Oscuridad en la periferia	Encastre impreciso del objetivo	Cambiar de objetivo y volver a colocarlo. Revisar el enroscado.
Desaparición del campo de visión	Condensador demasiado bajo	La posición será correcta cuando se forme el campo de visión del diafragma
	Condensador no centrado o montado incorrectamente	Centrarlo y revisar el montaje
	Campo del diafragma demasiado cerrado	Corregir apertura
	Lentes sucias	Limpieza
	Lámpara no montada correctamente	Volver a montar
	Combinación inadecuada del objetivo y condensador	Revisar combinación (sobre todo en el contraste de fases)
	Portafiltros mal situado	Corregir la posición
Diferencia de brillos y reparto inadecuado de la luz en el campo de visión	No está centrado el objetivo	Centrarlo hasta oír que se ha colocado
	Elementos de iluminación, condensadores y diafragmas no centrados	Procedimiento de iluminación Köhler (si además se emplea la iluminación por contraste de fases, centrar los anillos)
	Suciedad en las lentes del condensador. Agentes externos.	Limpieza. Revisar que no hay objetos interpuestos en la trayectoria de la luz.
Suciedad en el campo de visión	Condensador bajo	Corregir altura del condensador o la apertura del diafragma
	Apertura del diafragma muy reducida	
	Suciedad en las lentes	Limpieza
Imagen pobre, detalles no claros	Poca apertura del diafragma, condensador bajo	Corregir la apertura del diafragma o la altura del condensador
	No se usa aceite de inmersión	Emplear aceite sólo con el objetivo de inmersión (normalmente el objetivo 100x)
	Uso de aceite en objetivo inadecuado	
	Aire en el aceite	Retirar aceite
	Suciedad en las lentes	Limpieza
	Preparación mal efectuada	Comprobar el grosor del cubreobjetos, portaobjeto y medio de inclusión o montaje (si hubiera)
Color amarillo en la imagen	Lámpara con voltaje bajo	Ajustar voltaje de la lámpara
Imagen muy brillante	Lámpara con mucho voltaje	
La imagen se desplaza cuando varía el enfoque	Defecto en los mandos de enfoque	Reparación
Ausencia de formación de la imagen binocular	Distancia interpupilar inadecuada	Ajustar a la distancia ocular y corregir las dioptrías
	Dioptrías oculares no ajustadas	
	Iluminación inadecuada	

Tabla 1: Problemas que se presentan habitualmente durante la observación microscópica y que desencadenan en una mala imagen.

